

介质阻挡放电等离子体对不同 pH 值生长的酸土脂环酸芽孢杆菌的灭活作用

陈琳¹, 陈缘¹, 何亮亮¹, 李万华^{1*}, 汪浪红^{1,2,3*}, 曾新安^{2,3}

(1. 西北大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710069) (2. 佛山科技学院广东省食品智能制造重点实验室, 广东佛山 528225) (3. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究探讨了介质阻挡放电等离子体对不同 pH 值 (3.2、3.6、4.0 和 4.4) 下生长的酸土脂环酸芽孢杆菌的杀灭作用。研究发现等离子体对最适生长 pH 值 4.0 下的酸土脂环酸芽孢杆菌杀灭效率最低, pH 值升高 (4.4) 或降低 (3.2、3.6) 均引起致死率增加 ($P<0.05$)。例如 30 kV 处理 2 min 条件下, 等离子体对 pH 值为 4.0 生长的酸土脂环酸芽孢杆菌致死率为 4.8 个对数, 对 pH 值为 3.2、3.6 和 4.4 生长的菌体致死率分别为 5.9、5.4 和 5.1 个对数。等离子体对不同 pH 值培养的酸土脂环酸芽孢杆菌致死率的差异可能与菌体形态和膜脂质成分有关。扫描电镜观察发现, pH 值 3.2 和 3.6 培养的菌体出现异常伸长形态, 且酸土脂环酸芽孢杆菌在 pH 值 3.2 条件下更为明显, 更易被等离子体损伤而导致死亡。气相-质谱联用结果表明相比于最适 pH 值 4.0, pH 值 4.4 生长条件下环己烷十一酸相对含量显著提高 (67.86%), 而环戊烷十三酸降低 (22.21%) ($P<0.05$), 使得等离子体产生的氧自由基等成分在细胞膜中的堆积, 而导致菌体更易被杀灭。该研究表明菌体耐受性增加与酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜脂肪酸成分和形态变化存在一定的相关性。

关键词: 酸土脂环酸芽孢杆菌; 介质阻挡-空气低温等离子体; 形态变化; 膜脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2023)08-55-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1076

Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Grown at Different pH Values using Dielectric Barrier Discharge-atmospheric Cold Plasma

CHEN Lin¹, CHEN Yuan¹, HE Liangliang¹, LI Wanhua^{1*}, WANG Langhong^{1,2,3*}, ZENG Xin'an^{2,3}

(1.College of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China)

(2.Guangdong Key Laboratory of Food Intelligent Manufacturing, Foshan University, Foshan 528225, China)

(3.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of dielectric barrier discharge-atmospheric cold plasma (DBD-ACP) on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* grown at different pH values (3.2, 3.6, 4.0, and 4.4) were investigated. The inactivation efficiency against *A. acidoterrestris* grown optimally at pH 4.0 was the lowest. An increase in pH (4.4) and a decrease in pH (3.2, 3.6) both lead to increased lethality ($P<0.05$). The inactivation on *A. acidoterrestris* grown at pH 4.0 using DBD-ACP was 4.8 log under 30 kV treatment for 2 min and was 5.9, 5.4, and 5.1 log for *A. acidoterrestris* grown at pH 3.2, 3.6, and 4.4, respectively. The difference in the inactivation of *A. acidoterrestris* cells cultured at different pH using DBD-ACP could be attributed to the changes in morphology and membrane fatty acid composition of *A. acidoterrestris* cells. Scanning electron microscopy (SEM) observations indicated that the bacteria cultured at pH 3.2 and 3.6 displayed abnormal elongation, which was more obvious at pH 3.2, indicating an increased susceptibility to DBD-ACP. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) results indicated that the relative content of cyclohexanoundecanoic acid (67.86%) was

引文格式:

陈琳,陈缘,何亮亮,等.介质阻挡放电等离子体对不同 pH 值生长的酸土脂环酸芽孢杆菌的灭活作用[J].现代食品科技,2023,39(8):55-61

CHEN Lin, CHEN Yuan, HE Liangliang, et al. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Grown at different pH values using dielectric barrier discharge-atmospheric cold plasma [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 55-61

收稿日期: 2022-08-28

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划-青年项目 (2021JQ-448)

作者简介: 陈琳 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2511853294@qq.com

通讯作者: 李万华 (1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与加工, E-mail: wanhuali@nwnu.edu.cn; 共同通讯作者: 汪浪红 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品非热加工技术与食品微生物, E-mail: wlhong@fosu.edu.cn

significantly increased at pH 4.4, compared to that at optimum pH 4.0, whereas the cyclopentanetridecanoic acid content (22.21%) decreased ($P<0.05$), facilitating the accumulation of oxygen free radicals and other components generated by DBD-ACP in the cell membranes, and causing bacterial death. The higher tolerance of *A. acidoterrestris* to DBD-ACP is related to the changes in its fatty acid composition and morphology of the cell membrane.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*; dielectric barrier discharge-atmospheric cold plasma; morphological change; membrane fatty acids

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidoterrestris*) 是一类非致病性、产芽孢的嗜酸耐热菌, 大量研究表明这类细菌是引起苹果汁、橙汁等酸性果汁腐败的主要原因之一^[1-3]。被脂环酸芽孢杆菌污染的果汁在初期并不出现明显酸败或胀包现象, 很难直接观察到, 但其代谢产物如愈创木酚、2,6-二溴苯酚以及 2,6-二氯苯酚会使果汁出现口感和风味变劣、浊度升高等质量问题^[4], 进而给生产企业带来巨大的经济损失。巴氏灭菌处理 (70~90 °C) 是果汁加工中最常见的杀菌手段, 但是很难将其完全杀灭^[5,6]。鉴于其危害性, 脂环酸芽孢杆菌被认为是果汁加工中需控制的关键微生物之一^[7]。因此, 如何有效杀灭果汁中的脂环酸芽孢杆菌对于我国果汁行业的发展具有重要意义。

非热等离子体技术是由电离或部分电离的气体所产生的原子、电子、带电粒子、自由基、紫外线光子形成的集合体^[8]。等离子体能够在低温短时间杀灭食品中的各种微生物, 近几年被广泛运用于果汁、快餐食品、肉类制品等各类食品灭菌^[9-11]。研究表明, 细菌在遭受不良的环境状况如低温、酸或碱以及食品加工或储存中的高盐胁迫后会引入应激反应并通过相应的代谢过程对其产生耐受性^[12]。根据同源耐受性原理, 产生适应的细菌会对同一胁迫条件产生更高的耐受性^[13]。另外, 遭受胁迫的细菌可能还会诱发交叉耐受性反应, 进而产生对不同的条件如酸、热环境产生高耐受性^[14,15]。果汁是一种高酸环境体系 (pH 值为 3.2~5.0), 不同的酸性环境对脂环酸芽孢杆菌造成酸胁迫, 并引起应激反应。然而, pH 值介导下的酸土脂环酸芽孢杆菌对等离子体的耐受性的高低并未见相关报道。

因此, 本文从酸土脂环酸芽孢杆菌在不同 pH 值下的生长速率、形态变化, 并基于气相-质谱联用法分析酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜脂肪酸成分的差异, 探究 pH 值介导下酸土脂环酸芽孢杆菌与等离子耐受性之间的关系, 本文对于全面了解脂环酸芽孢杆菌在不同 pH 值下的生长特性及对等离子体耐受性机理具有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 原料

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025) 采购广东微生物研究所微生物培养物保藏中心提供。细菌脂肪酸甲酯标准溶液, 美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器设备

CTP-2000K 等离子体设备 (装配 DBD-50 反应器), 南京苏曼有限公司; UV-1800 岛津紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 8890B-7000D 气相-质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; 扫描电镜仪, 日本日立有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化与培养

将安瓿管中的酸土脂环酸芽孢杆菌转移至 AAM 培养基中, 于摇床中在 45 °C 条件下隔夜培养。用接种环沾取酸土脂环酸芽孢杆菌培养物于固体培养基中进行划线, 放置培养箱中于 45 °C 温度下培养 24.0 h 进行菌种活化。将含酸土脂环酸芽孢杆菌培养物接种至新鲜 AAM 培养基中 (pH 值 3.2、3.6、4.0 和 4.4), 45 °C 下进行培养, 并测定其生长曲线。

1.3.2 细胞膜脂肪酸提取与分析

不同 pH 值下将酸土脂环酸芽孢杆菌培养至稳定初期, 离心收集菌体。根据 Wang 等^[16]报道的方法进行膜脂肪酸提取与甲基化, 具体方法如下: (1) 取菌体 40~50 mg 加入 1.0 mL 皂化液 (4.5 g NaOH, 15.0 mL 甲醇, 15.0 mL 蒸馏水), 浸泡在沸水浴中充分混合 30 min; (2) 冷却至室温后, 加入 2.0 mL 甲基化溶液 (32.5 mL 6.0 mol/L HCl 和 27.5 mL 甲醇), 80 °C 水浴 10 min 后冷却至室温; (3) 加入 1.25 mL 的萃取液 (正己烷/甲基叔丁基醚, $V/V=1:1$) 充分混合, 去除水相; (4) 加入 3.0 mL 0.3 mol/L NaOH, 将一定量的有机相移到气相小瓶, 并作气质联用分析。

1.3.3 DBD-等离子体处理

介质阻挡放电等离子体 (DBD-ACP) 设备原理图如图 1 所示, 产生等离子体的气源为空气。将酸土脂环酸芽孢杆菌培养至稳定初期, 离心重悬于等体积的

无菌生理盐水和苹果汁之中。取 4.0 mL 菌液于 20 kV 和 30 kV 电压下处理 0、0.5、1.0 和 2.0 min，其中高压电极板和样品表面距离为 5 mm，频率为 1.0 kHz。处理后的菌液进行梯度稀释并涂布，于 45 °C 下培养 36.0~48.0 h 以检测菌落总数 (CFU/mL)，根据处理前后菌落数变化分析致死率。每次处理重复三次，实验结果取平均值。

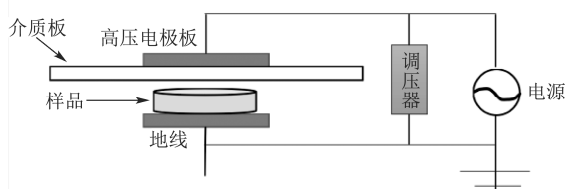


图 1 介质阻挡放电 (DBD) 等离子体处理实验装置原理图

Fig.1 Schematic of a dielectric barrier discharge (DBD) plasma treatment experimental device

1.3.4 扫描电镜观察

扫描电镜制样参考之前的方法进行^[17]：将不同 pH 值 (3.2、3.6、4.0 和 4.4) 培养的酸土脂环酸芽孢杆菌进行菌体收集 (离心, 4 000 g, 5.0 min)，并用含 2.5% (V/V) 戊二醛的 PBS 缓冲液在 4 °C 条件下保存过夜。离心后分别使用 $\varphi=30\%\sim 100\%$ 乙醇溶液对细菌样品进行梯度脱水。脱水后的菌体用叔丁醇处理两次，然后将样品滴在锡箔纸上进行真空冷冻干燥，喷金后即可观察酸土脂环酸芽孢杆菌形态变化。

1.3.5 统计学分析

所有数据均以 Origin Pro 8 作图，采用 SPSS Statistics 22 作数据分析分析，结果用平均值 $\pm$ 标准差来表示，每组试验平行 3 次。

2 结果与讨论

2.1 酸土脂环酸芽孢杆菌的生长动力学分析

通过测量 OD_{600 nm} 值绘制生长曲线，研究不同 pH 值对酸土脂环酸芽孢杆菌生长的影响。如图 2 所示，不同 pH 值培养基培养下，酸土脂环酸芽孢杆菌生长速率存在一定的差异。其中，pH 值 4.0 条件下酸土脂环酸芽孢杆菌生长速率最快，培养 6 h 后即进入生长对数期，20 h 后进入生长稳定期。pH 值 3.6 和 4.4 条件下培养的酸土脂环酸芽孢杆菌生长有轻微的延迟，分别在 10 h 后和 22 h 后进入生长对数期和生长稳定期。相比之下，酸土脂环酸芽孢杆菌在 pH 值 3.2 下生长被显著抑制，培养 16 h 后才进入对数生长期，36 h 后才进入稳定期。另外，从图中可以看出，到达稳定期后，不同 pH 值培养下的酸土脂环酸芽孢杆菌的生长总量 (OD_{600 nm}) 存在差异，依次为 pH 值 4.0>4.4 $\approx$ 3.6

>3.2。不同 pH 值下生长的菌体总量和生长延迟的现象与 Zhao 等^[18]报道的结果一致，表明不同的 pH 值培养下对酸土脂环酸芽孢杆菌的生长总量 (OD₆₀₀) 有一定的影响。

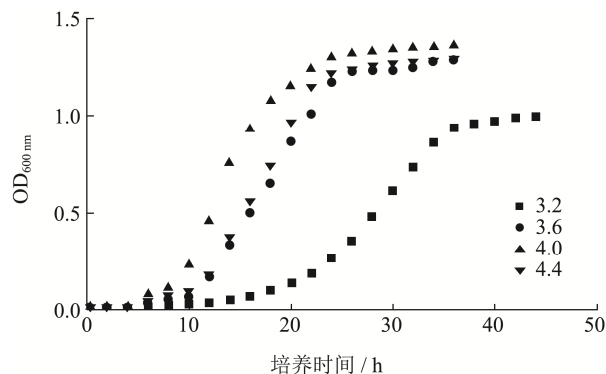


图 2 不同 pH 值下酸土脂环酸芽孢杆菌的生长曲线

Fig.2 Growth curves of *Alicyclobacillus acidoterrestris* under various pH

2.2 不同 pH 值下酸土脂环酸芽孢杆菌的形态变化

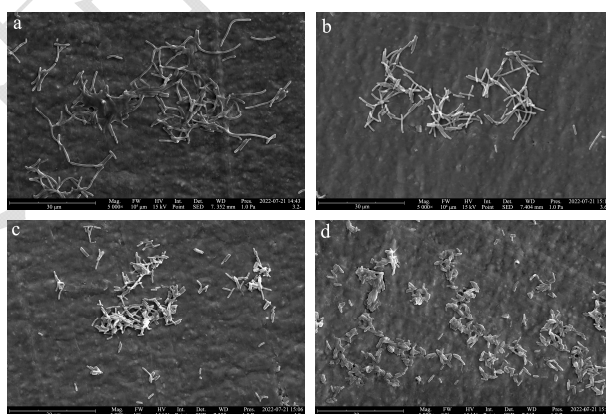


图 3 不同 pH 值下酸土脂环酸芽孢杆菌菌体形态变化

Fig.3 Morphological changes of *Alicyclobacillus acidoterrestris* under different growth pH

注：(a) 3.2；(b) 3.6；(c) 4.0；(d) 4.4。

采用扫描电镜对菌体形态进行观察，进一步研究不同 pH 值生长环境对酸土脂环酸芽孢杆菌生长的影响，结果如图 3a~d 所示。从图 3c 和 d 看到，pH 值 4.0 和 4.4 生长下的酸土脂环酸芽孢杆菌菌体呈现短杆状，为正常形态特征，与之前的文献结果一致^[19]；然而酸土脂环酸芽孢杆菌在 pH 值 3.2 与 3.6 生长条件下出现异常伸长，呈现丝状形态，且 pH 值 3.2 培养的菌体更为明显。Zhao 等^[18]也发现低 pH 值 (2.8 和 3.4) 培养下酸土脂环酸芽孢杆菌表现出类似的菌体形态延长的现象。Wehrens 等^[20]在大肠杆菌上发现 42 °C 的培养温度对大肠杆菌进行胁迫，发现细菌能比正常状态

下伸长 10~20 倍, 最长能达到 40 μm , 但是宽度几乎不变, 最终表现为长丝状。这种菌体的丝化现象被认为是细菌在应对外部环境应激时的自我保护机制之一^[20]。

2.3 DBD-等离子体对酸土脂环酸芽孢杆菌的

杀灭作用分析

不同 pH 值条件下培养的菌体经离心、洗涤并重新分散于无菌生理盐水溶液和非浓缩苹果汁中, 采用 DBD-等离子体进行处理。处理后的酸土脂环酸芽孢杆菌梯度稀释并进行平板培养, 进而分析 DBD-等离子体对不同 pH 值生长的菌体的致死作用, 结果如图 4 所示。从图中可以看出, 在生理盐水 (图 4a 和 b) 和苹果汁 (图 4c 和 d) 中, DBD-等离子体对酸土脂环酸芽孢杆菌的灭活量均随着处理电压和时间的增加而增大, 且对不同 pH 值生长下的酸土脂环酸芽孢杆菌杀灭效率表现出一定差异。例如当处理电压为 20 kV, 时间为 1.0 min 条件下, DBD-等离子体处理对 pH 值为 3.2 条件培养的酸土脂环酸芽孢杆菌杀灭效率为 3.0 个对数 (图 4a)。相比之下, DBD-等离子体对 pH 值为 3.6 条件下培养的菌体灭活数显著降低, 仅为 3.6 个对数 ($P<0.05$), 且 pH 值为 4.0 条件生长的酸土脂环酸芽孢杆菌的死亡数量最低, 约为 1.1 个对数 ($P<0.05$)。当处理时间为 2.0 min 时, 不同 pH 值培养下的酸土脂环酸芽孢杆菌灭活量都有一定的提高, 但不同温度之间酸土脂环酸芽孢杆菌的灭活量仍有差异。其中 DBD-等离子体处理引起 pH 值 3.2 条件培养的酸土脂环酸芽孢杆菌灭活量为 4.7 个对数, 导致 pH 值为 3.6 和 4.0 培养的酸土脂环酸芽孢杆菌的失活量则分别为 4.2 和 2.7 个对数 ($P<0.05$)。当处理电压为 30 kV, 处理时间为 2.0 min 时 (图 4b), pH 值 3.2、3.6 和 4.0 条件下培养的酸土脂环酸芽孢杆菌灭活量分别达 5.9、5.4 和 4.8 个对数。以苹果汁为处理体系也展现出类似的现象 (图 4c 和 d)。

pH 值为 3.2~4.0 范围内, 酸土脂环酸芽孢杆菌对等离子体的耐受性的高低可能与菌体形态直接相关。研究表明, DBD-等离子体处理时能够产生自由基如活性氮类和活性氧类物质^[8,21], 对细菌表面产生强烈的刻蚀作用导致细胞膜的破裂, 进而引起菌体死亡。因此菌体表面积越大, 所遭受的自由基损伤越严重^[22]。相比于最适 pH 值 4.0, pH 值 3.2 和 3.6 条件下培养的酸土脂环酸芽孢杆菌呈长杆状, 表面积显著增加, 由等离子体引起的致死率显著增加。pH 值 3.2 条件下培养的菌体长杆状数量更多、且长度相对更大, 因而死亡率最高。

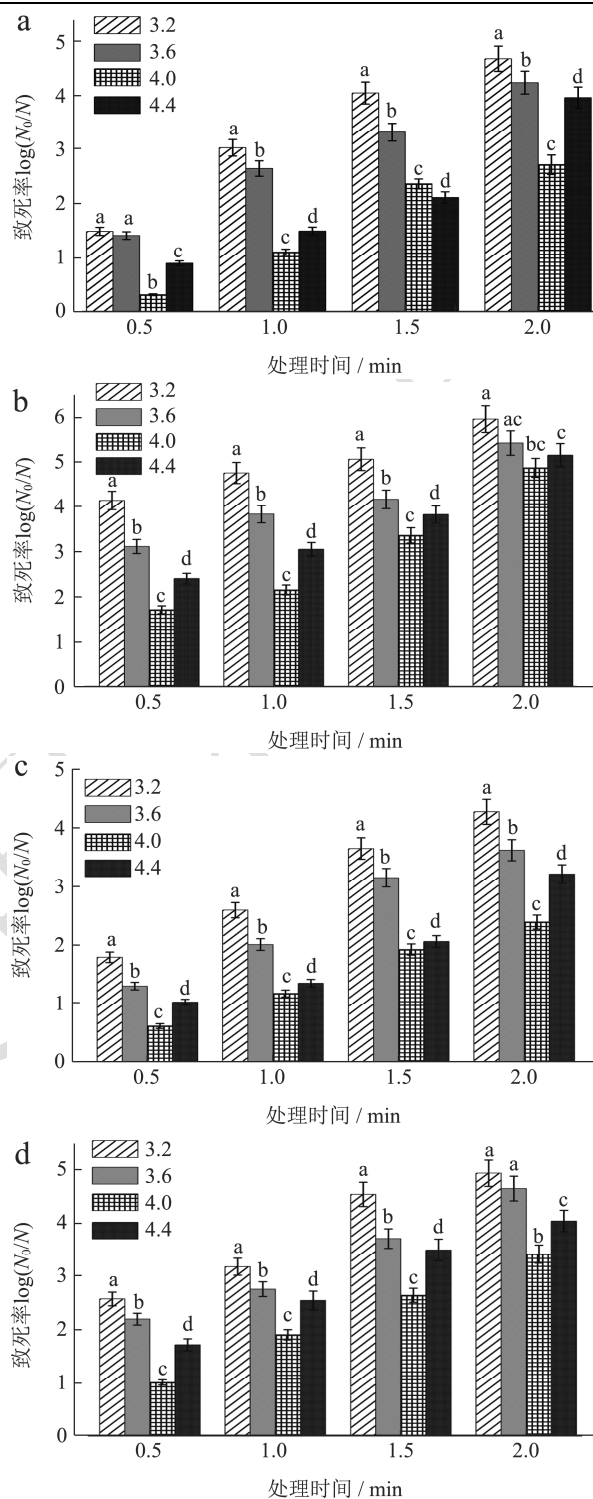


图 4 DBD-等离子体在不同电压和时间对不同 pH 值培养的酸土脂环酸芽孢杆菌杀灭作用

Fig.4 Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* cells by DBD-plasma at various voltages and treatment time

注: 无菌生理盐水, 电压 (a) 20 kV, (b) 30 kV; 苹果汁, 电压 (c) 20 kV, (d) 30 kV; 同组内不同字母代表显著性差异 ($P<0.05$)。

值得注意的是, DBD-等离子体对 pH 值为 4.4 条件下培养的酸土脂环酸芽孢杆菌形态正常, 相比于 pH

值 4.0 生长的菌体表现出致死率更高的现象。该结果可能与菌体膜脂质存在一定关系。大量研究表明,环境的改变可介导细菌细胞膜脂肪酸组成进而影响其对热与非热灭菌技术如脉冲电场、等离子体和超高压等的耐受性^[23,24]。例如, Wang 等^[12]研究发现金黄色葡萄球菌对脉冲电场的耐受性与细胞膜支链/直链脂肪酸含量有一定的联系,柚皮素介导的金黄色葡萄球菌为了增加细胞膜流动性,合成了更多的支链脂肪酸,进而更易被脉冲电场击穿。Pan 等^[24]研究了不同温度下李斯特菌对等离子体的耐受性,结果表明温度越低

李斯特菌对等离子体的耐受性越强,认为主要与低温下李斯特菌细胞膜中的支链脂肪酸(Anteiso-C15:0)相对含量增加有关,这类脂肪酸与亲水性活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)相互作用,降低 ROS 渗入细胞内部的效率,提高了李斯特菌对等离子体对 DBD-等离子体的耐受性。

2.4 不同 pH 值下的酸土脂环酸芽孢杆菌膜脂 脂肪酸分析

表 1 不同 pH 值培养下的酸土脂环酸芽孢杆菌的膜脂肪酸种类

Table 1 Membrane fatty acid composition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* under different growth pH

脂肪酸种类	不同 pH 值生长条件下相对含量/%			
	3.2	3.6	4.0	4.4
肉豆蔻酸 (C14:0)	1.51±0.15 ^a	1.27±0.17 ^a	1.23±0.12 ^a	0.66±0.19 ^a
棕榈酸 (C16:0)	3.36±0.52 ^a	4.79±0.84 ^b	5.19±0.61 ^{bc}	6.35±0.49 ^c
硬脂酸 (C18:0)	3.42±0.49 ^a	3.11±0.33 ^a	2.53±0.38 ^b	2.85±0.48 ^b
棕榈油酸 (C16:1 ω 9)	1.11±0.32 ^a	0.65±0.13 ^b	未检出 c	未检出 c
油酸 (C18:1 ω 9)	1.27±0.19 ^a	0.69±0.12 ^b	未检出 c	未检出 c
环己烷基-11-十一烷酸 (ω -Cyclohexyl C17:0)	35.49±1.23 ^a	48.37±1.63 ^b	59.21±1.53 ^c	67.86±1.83 ^d
环戊烷基-13-十三烷酸 (ω -Cyclopentane C18:0)	53.83±1.53 ^a	40.94±1.81 ^b	31.61±1.47 ^c	22.21±1.86 ^d
总环状脂肪酸	89.12±2.78 ^a	89.31±3.44 ^a	90.82±3.0 ^a	90.07±3.69 ^a
总不饱和脂肪酸	2.38±0.51 ^a	1.34±0.25 ^b	未检出 c	未检出 c
总饱和脂肪酸	8.29±1.16 ^a	9.17±1.34 ^a	8.95±1.01 ^a	9.86±1.16 ^a

注: 同行不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

为了验证酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜脂脂肪酸成分与其对等离子体耐受性之间的关系,不同 pH 值下培养至稳定期初期的酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜脂脂肪酸成分经提取,甲酯化和气质联用分析,结果如表 1 所示。所检测出的脂肪酸种类主要为 7 种,分别为肉豆蔻酸 (C14:0)、棕榈酸 (C16:0)、硬脂酸 (C18:0)、棕榈油酸、油酸、环己烷十一酸 (ω -Cyclohexyl C17:0) 和环戊烷十三酸 (ω -Cyclopentane C18:0)。这些膜脂脂肪酸可以分为三类,即直链脂肪酸、不饱和脂肪酸和环状脂肪酸。从表中可以看出,在不同 pH 值条件下酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜中以上三类脂肪酸的总量没有太大变化 ($P>0.05$),但单一脂肪酸成分存在显著差异 ($P<0.05$)。其中环己烷-11-十一酸在培养 pH 值为 3.2 时相对含量最低,占 35.49%。随着培养 pH 值的增加 (3.2~4.4),环己烷-11-十一酸含量逐步增加,分别占 48.37%、59.21%和 67.86% ($P<0.05$)。相比之下,环戊烷-13-十三酸的含量则出现下降的趋势,随着 pH 值的升高从 53.83%降低至 40.94%、31.61%和 22.21%。研究表明,细菌处于不同环境下,为了维持一个合适的细胞膜流动性,会改变细胞膜中不同脂

脂肪酸的含量^[25,26]。其中直链脂肪酸可在细胞膜中排列整齐,堆叠性好而紧密。因此直链脂肪酸在细胞膜中所占比例越高,细胞膜的流动性越低^[16]。相比之下,支链脂肪酸堆叠性差所占空间更大,因此更有利于增加细胞膜的流动性^[24]。 ω -环状脂肪酸是一类较为特殊的支链脂肪酸,主要出现在嗜酸耐热菌细胞膜中,且含量可达到 60%~90%。本研究中,酸土脂环酸芽孢杆菌为嗜酸耐热菌,环己烷-11-十一酸和环戊烷-13-十三酸占比超过 80%。研究表明,堆叠疏松的 ω -脂环脂肪酸可通过形成动态屏障,限制脂质扩散和 H^+ 的跨膜扩散,从而保护嗜酸耐热菌的免受 H^+ 的毒害作用^[27]。最近的研究表明, ω -环状脂肪酸在细胞膜中的堆积松散,引起脂质尾部的有序度降低进而导致细胞膜流动性增加,并且 ω -脂环脂肪酸中的环尺寸越大,其作用越明显^[28]。本研究中随着培养 pH 值的上升 (3.2~4.4),酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜中环己烷-11-十一酸的相对含量逐步增加,从 48.37%增加至 67.86% ($P<0.05$),而环戊烷-13-十三酸的含量从 53.83%减少至 22.21%。该结果表明, pH 值的升高,酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜流动性逐步增加。由此可推断,在低 pH 值条件下,

酸土脂环酸芽孢杆菌通过调整环己烷-11-十一酸与环戊烷-13-十三酸的相对比例降低细胞膜流动性,进而适应低 pH 值环境达到生长的目的。

与低酸(H^+)作用机制不同,等离子体处理过程中会产生各类活性氧、活性氮成分如臭氧、羟基自由基、单线态氧自由基等会损害脂肪酸的功能,诱导脂质尤其是不饱和脂肪酸的过氧化,甚至破坏细胞膜导致细胞裂解而引起细菌死亡^[29,30]。另外,等离子体处理产生的自由基还能跨过细胞膜进入细胞质攻击核酸等生物大分子^[31]。由此可以推断,环己烷-11-十一酸可能更有利于氧自由基等成分在细胞膜中的堆积,不仅引起细胞膜的破坏,还增加了氧自由基等成分的进入而引起细胞死亡。因此,相比于 pH 值 4.0, pH 值 4.4 条件下生长的菌体细胞膜中环己烷-11-十一酸含量的增加,是其对等离子体耐受性降低的潜在原因。

3 结论

本研究探讨了不同 pH 值生长条件对 DBD-空气低温等离子体灭活酸土脂环酸芽孢杆菌的影响,结果表明不同 pH 值条件下生长的酸土脂环酸芽孢杆菌对 DBD-空气低温等离子体的耐受性存在差异。其中 pH 值 3.2 条件下生长的菌体耐受性最低, pH 值升高(3.2~4.0),菌体耐受性逐步增强,然而 pH 值 4.4 条件下生长的菌体对等离子体耐受性并未进一步增强,反而表现出降低的趋势。这种耐受性的差异主要与菌体形态和菌体膜脂质有关。扫描电镜结果表明, pH 值 3.2 和 3.6 条件下生长的菌体呈现长杆状,使其表面积增大,因而菌体更易被自由基损伤而导致死亡。气相-质谱联用结果显示不同培养温度下酸土脂环酸芽孢杆菌细胞膜成分有一定的差异,且 pH 值的升高使细胞膜中环己烷-11-十一酸含量逐步升高,而环戊烷-13-十三酸则逐步降低。这种变化使 pH 值 4.4 培养下的酸土脂环酸芽孢杆菌耐受性降低更易被 DBD-空气低温等离子体导致氧化损伤而死亡。

参考文献

- [1] Tremarin A, Canbaz E A, Brandão T R S, et al. Modelling *Alicyclobacillus acidoterrestris* inactivation in apple juice using thermosonication treatments [J]. Lwt, 2019, 102: 159-163.
- [2] Wahia H, Zhou C, Fakayode O A, et al. Quality attributes optimization of orange juice subjected to multi-frequency thermosonication: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore inactivation and applied spectroscopy ROS characterization [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130108.
- [3] Wahia H, Zhang L, Zhou C, et al. Pulsed multi frequency thermosonication induced sonoporation in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and vegetative cells [J]. Food Research International, 2022, 156: 111087.
- [4] Wang Z, Liang Y, Wang Q, et al. Integrated analysis of transcriptome and proteome for exploring the mechanism of guaicol production by *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Food Research International, 2021, 148: 110621.
- [5] 翟娅菲,田佳丽,石佳佳,等.短波紫外发光二极管处理对脂环酸芽孢杆菌的灭活效果及作用机制[J].食品科学,2022, 43(9):71-78.
- [6] Wang L H, Chen L, Zhao S Q, et al. Inactivation efficacy and mechanisms of atmospheric cold plasma on *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Insight into the influence of growth temperature on survival [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1012901.
- [7] Flauzino J M R, Peres R C S, Alves L M, et al. DNA electrochemical biosensor for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizing Hoechst 33258 as indicator [J]. Bioelectrochemistry, 2021, 140: 107801.
- [8] 秦嘉乐,李重言,刘茜,等.等离子体处理对小米内源酶活性及其品质的影响[J].现代食品科技,2022,38(8):66-72.
- [9] 张晔,刘志伟,谭兴和,等.冷等离子体食品杀菌应用研究进展[J].中国酿造,2019,38(1):20-24.
- [10] 李嘉慧,成军虎,韩忠.低温等离子体活性水在食品领域的应用进展[J].保鲜与加工,2020,20(4):207-214.
- [11] Ozen E, Singh R K. Atmospheric cold plasma treatment of fruit juices: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 103: 144-151.
- [12] Wang L H, Wen Q H, Zeng X A, et al. Influence of naringenin adaptation and shock on resistance of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to pulsed electric fields [J]. LWT, 2019, 107: 308-317.
- [13] Abeyundara P D, Dhowlaghar N, Nannapaneni R. Influence of cold stress on the survival of *Listeria monocytogenes* Bug600 and ScottA in lethal alkali, acid and oxidative stress [J]. LWT, 2019, 100: 40-47.
- [14] He S K, Cui Y, Qin X J, et al. Influence of ethanol adaptation on *Salmonella enterica* serovar enteritidis survival in acidic environments and expression of acid tolerance-related genes [J]. Food Microbiology, 2018, 72: 193-198.
- [15] Haberbeck Lu, Wang X, Michiels C, et al. Cross-protection between controlled acid-adaptation and thermal inactivation for 48 *Escherichia coli* strains [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 241: 206-214.

- [16] Wang L H, Wang M S, Zeng X A, et al. Membrane destruction and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cells induced by carvacrol and its combined effect with a pulsed electric field [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(32): 6355-6363.
- [17] Wen Q H, Wang R, Zhao S Q, et al. Inhibition of biofilm formation of foodborne *Staphylococcus aureus* by the citrus flavonoid naringenin [J]. Foods, 2021, 10(11): 2614.
- [18] Zhao N, Zhang J, Qi Y, et al. New insights into thermo-acidophilic properties of *Alicyclobacillus acidoterrestris* after acid adaptation [J]. Food Microbiology, 2021, 94: 103657.
- [19] Song Z, Niu C, Wu H, et al. Transcriptomic analysis of the molecular mechanisms underlying the antibacterial activity of IONPs@ pDA-Nisin composites toward *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(24): 21874-21886.
- [20] Wehrens M, Ershov D, Rozendaal R, et al. Size laws and division ring dynamics in filamentous *Escherichia coli* cells [J]. Current Biology, 2018, 28(6): 972-979.
- [21] Cheng J H, Lv X, Pan Y, et al. Foodborne bacterial stress responses to exogenous reactive oxygen species (ROS) induced by cold plasma treatments [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 103: 239-247.
- [22] Lee K N, Paek K, Ju W T, et al. Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen [J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(3): 269-275.
- [23] Hayman M M, Anantheswaran R C, Knabel S J. The effects of growth temperature and growth phase on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in whole milk subject to high pressure processing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115(2): 220-226.
- [24] Pan Y, Zhang Y, Cheng J H, et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* at various growth temperatures by ultrasound pretreatment and cold plasma [J]. LWT, 2020, 118: 108635.
- [25] Cebrián G, Condón S, Mañas P. Heat resistance, membrane fluidity and sublethal damage in *Staphylococcus aureus* cells grown at different temperatures [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 289: 49-56.
- [26] Alvarez-Ordóñez A, Halisch J, Prieto M. Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and *Enteritidis* after adaptation to stressful growth conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1-2): 97-105.
- [27] Oshima M, Ariga T. Omega-cyclohexyl fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria. Studies on their presence, structure, and biosynthesis using precursors labeled with stable isotopes and radioisotopes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(17): 6963-6968.
- [28] Poger D, Mark A E. Effect of ring size in ω -alicyclic fatty acids on the structural and dynamical properties associated with fluidity in lipid bilayers [J]. Langmuir, 2015, 31(42): 11574-11582.
- [29] Korachi M, Gurol C, Aslan N. Atmospheric plasma discharge sterilization effects on whole cell fatty acid profiles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Electrostatics, 2010, 68(6): 508-512.
- [30] Korachi M, Gurol C, Aslan N. Atmospheric plasma discharge sterilization effects on whole cell fatty acid profiles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Electrostatics, 2010, 68(6): 508-512.
- [31] Ziuzina D, Patil S, Cullen P J, et al. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce [J]. Food Microbiology, 2014, 42: 109-116.